

# 怀地黄脱毒试管苗培养条件的优化

陈明霞<sup>1,2</sup>, 周彩云<sup>1</sup>, 李翔<sup>3</sup>, 刘好书<sup>1,4</sup>, 董娜<sup>1</sup>,

唐果<sup>1</sup>, 尚潇歌<sup>1</sup>, 张晓丽<sup>1,2</sup>, 李明军<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南省高校地道中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007; 3. 河南师范大学 体育学院, 河南 新乡 453007; 4. 浚县实验中学, 河南 浚县 456250)

**摘要:** 研究了怀地黄脱毒试管苗在不同 pH 值、不同光照强度和不同温度下形态指标的差异, 以寻求怀地黄脱毒试管苗的最适培养条件。结果表明: 适合培养怀地黄脱毒试管苗的 pH 值在 5.8~6.2, 该 pH 值范围内, 试管苗生长较健壮, 株高和繁殖系数最大, 分别为 6.66 cm 和 4.8。最适合培养怀地黄脱毒试管苗的光照强度为 2500 lx, 此光照强度下, 试管苗生长较健壮, 叶色浓绿, 株高和繁殖系数分别为 5.2 cm 和 4.6。最适合培养怀地黄脱毒试管苗的环境温度值为 30℃, 该温度下试管苗生长较健壮, 株高和繁殖系数最高, 分别为 5.8 cm 和 4.8。因此, 适合怀地黄脱毒试管苗生长的 pH 值为 5.8~6.2、光照强度为 2500 lx、温度为 30℃。

**关键词:** 怀地黄; 脱毒试管苗; pH; 光照强度; 温度

**中图分类号:** S567.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)05-0128-05

## Optimization for Culture Condition of Virus-free Plantlets of *Rehmannia glutinosa* f. *Hueichingensis* (Chanet Seih) Hsiao.

CHEN Ming-xia<sup>1,2</sup>, ZHOU Cai-yun<sup>2</sup>, LI Xiang<sup>2</sup>, LIU Hao-shu<sup>1,4</sup>, DING Hong-na<sup>1</sup>,

TANG Guo<sup>1</sup>, SHANG Xiao-ge<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-li<sup>1,2</sup>, LI Ming-jun<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang 453007, China;

3. College of Physical Education, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

4. Xunxian Experimental Middle School, Xunxian 456250, China)

**Abstract:** In this paper, the morphological parameters of virus-free plantlets of *Rehmannia glutinosa* f. *Hueichingensis* (Chanet Seih) Hsiao. were studied under different growing environment (pH value, different illumination intensity and different temperature) to find the optimum culture condition. The results were as follows: The optimum pH value was between 5.8 and 6.2, and the plantlets were healthy under pH 5.8—6.2, the highest height and propagation coefficient were 6.66 cm and 4.8, respectively. The optimum illumination intensity was about 2500 lx and plantlets were healthy under this illumination condition, the colour of leaves was deep green, plant height and propagation coefficient was 5.2 cm and 4.6, re-

收稿日期: 2010-11-05

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2009GB2D000226); 河南省教育厅科技攻关项目(2010A180009); 河南师范大学青年科学基金(201qk14); 河南师范大学大学生创新性实验项目(2008419)

作者简介: 陈明霞(1973-), 女, 河南南阳人, 讲师, 博士, 主要从事植物组织培养教学及药用植物生物技术应用研究。

E-mail: chenmx1973@gmail.com

\*通讯作者: 李明军(1962-), 男, 河南温县人, 教授, 博士, 主要从事植物生理学教学及植物生物技术应用研究。

E-mail: limingjun2002@263.net

spectively. The best proper temperature was 30℃, and the plant height and propagation coefficient were 5.8cm and 4.8, respectively. In a conclusion, the optimum condition for growth of virus-free plantlets of *Rehmannia glutinosa* f. *Hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao. was; pH 5.8—6.2 illumination intensity 2500lx, and the proper temperature 30℃.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* f. *Hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao.; Virus-free plantlet; pH value; Illumination intensity; Temperature

怀地黄(*Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao.)为玄参科药用草本植物,是驰名中外的“四大怀药”之一,主产于河南温县、武陟、沁阳等地<sup>[1]</sup>。怀地黄以根茎入药,其性凉,味酸涩,具有清热凉血、调经、解毒之功效<sup>[2-3]</sup>,其有效成分有地黄素、强心甙、梓醇、水苏糖、氨基酸、有机酸、维生素等<sup>[4]</sup>。

20世纪90年代中期,开始对怀地黄的愈伤组织诱导、分化和再生植株的生长调控、快繁进行了研究<sup>[5-10]</sup>,已建立了怀地黄试管苗脱毒快繁及病毒检测技术体系,获得了大量脱毒苗,并在生产中进行应用,取得了良好的增产效果。为了进一步优化怀地黄脱毒试管苗培养条件,本研究以怀地黄脱毒试管苗为材料,研究了培养基pH值、光照条件和温度对其生长发育的影响,以寻求试管苗最佳培养条件,使怀地黄优良种苗得到快速繁殖,为其规模化生产及大田推广应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验材料为河南省高校道地药材保育及利用工程技术研究中心“四大怀药”组织培养研究室(河南师范大学生命科学学院)通过茎尖培养结合热处理获得的怀地黄脱毒试管苗。

### 1.2 试验方法

培养基采用MS+NAA 0.02mg/L+6-BA 0.2mg/L+白糖30g/L,在超净工作台上将脱毒试管苗切成2.5~3cm的带芽茎段(一叶一芽),接种到不同pH值的培养基上或放入不同的培养环境,每天进行观察,从第10天开始记录数据,之后每3d观察记录一次,记录株高(从新芽基部到芽尖的垂直高度)、叶片数、根数、叶片颜色及茎生长情况。培养基pH梯度设置为5.4、5.8、6.0、6.2和6.6;光照强度梯度设置为500、1400、2500、3200、4000lx;温度梯度设置为20℃、25℃和30℃。

除了各试验组的特定处理外,其他培养基pH调至6.0,并在121℃、1.1kg/cm<sup>2</sup>的压力下灭菌20min,培养温度为(28±2)℃,光强为2000lx,光

照时间为14h/d。

### 1.3 数据的分析与处理

试验数据用Excel软件计算和作图,并用SPSS11.5统计软件对所得数据进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH值对怀地黄脱毒试管苗生长发育的影响

从图1可以看出,在5.4~6.6范围内,随培养基pH值的增加,怀地黄脱毒试管苗的株高、叶片数、根数、繁殖系数均呈先增加后降低的趋势,pH值为6.2时,怀地黄脱毒试管苗的株高最高。培养基pH值为6.0时,茎生长最健壮;pH值为5.4~6.0时,叶片数较多,培养31d时,pH值为6.0的处理叶片数最多,叶色也较浓绿;pH值为5.8~6.0时,怀地黄脱毒试管苗的根数较多;pH值为5.4~6.2时,怀地黄脱毒试管苗的繁殖系数较高,为4.6~4.8。

方差分析结果显示,不同的pH值对怀地黄脱毒试管苗繁殖系数的影响差异均不显著。所以,适合怀地黄脱毒试管苗生长的pH值为5.8~6.2。

### 2.2 光照强度对怀地黄脱毒试管苗生长发育的影响

从图2可以看出,在550~4000lx范围内,随着光照强度的增强,怀地黄脱毒试管苗的株高逐渐降低,茎由细弱变得逐渐粗壮;当光照强度为550lx时,试管苗生长最为迅速,在整个生长过程中株高一直最高;叶色也逐渐加深,叶片数逐渐减少;根数逐渐增加;试管苗繁殖系数先略微增加后减少,光照强度为1400lx和2500lx时较高,4000lx时繁殖系数最低。

方差分析显示,光照强度为550lx与2500lx、3200lx时的株高、叶片数、根数达到了显著性差异;繁殖系数最高的光照强度为550lx,与光照强度3200lx和4000lx时有显著性差异,但与光照强度1400lx和2500lx无明显差异。

由以上结果可知,低光照强度下,怀地黄脱毒试管苗株高、叶片数、根数较多,繁殖系数也较高,但叶面积小,叶色偏黄,茎生长细弱多分支,长势不好,不利于继代;高光照强度下,怀地黄脱毒试管苗叶面积

大, 叶片徒长, 株高增加, 但繁殖系数低, 且生产成本过高。所以, 适宜怀地黄脱毒试管苗生长的最适光

照强度应该在 2 500 lx, 此时株高为 5. 2 cm, 繁殖系数为 4. 8, 并且叶片颜色偏深绿, 茎生长粗壮。

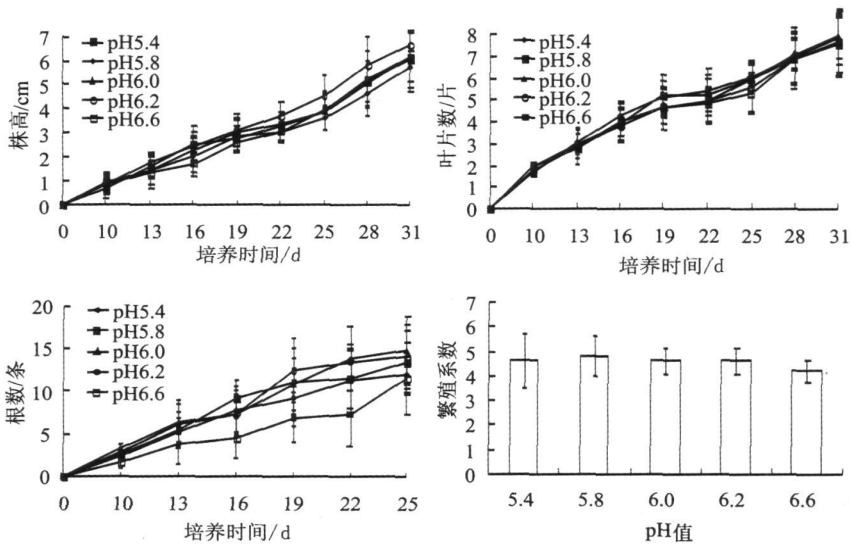


图 1 pH 值对怀地黄脱毒试管苗株高、叶片数、根数和繁殖系数的影响

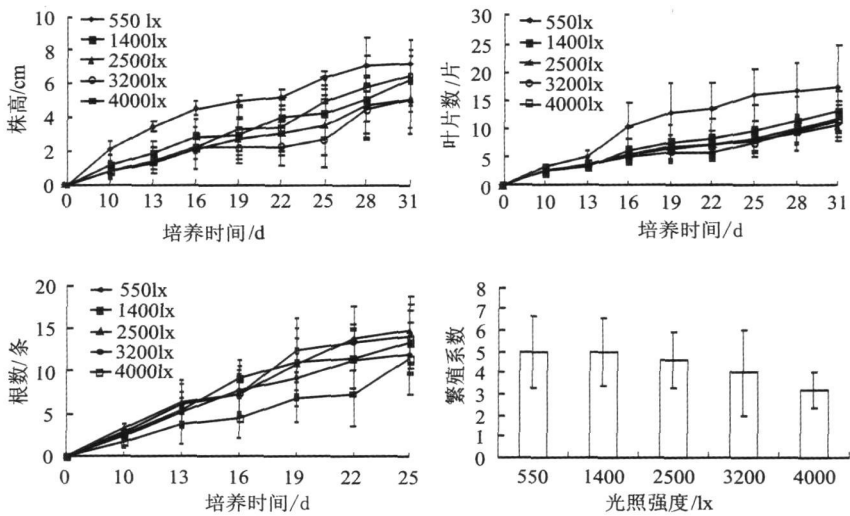


图 2 光照强度对怀地黄脱毒试管苗株高、叶片数、根数和繁殖系数的影响

2.3 温度对怀地黄脱毒试管苗生长发育的影响

温度对怀地黄脱毒试管苗株高有显著影响。在 20~30℃范围内, 随着温度的升高, 株高逐渐增加 (图 3), 茎逐渐变得粗壮; 叶片数逐渐增加, 叶色逐渐加深; 试管苗根数和繁殖系数也逐渐增加。方差分析结果显示, 30℃环境下生长的怀地黄脱毒试管苗的株高极显著高于 20℃和 25℃下的株高, 20℃和 25℃条件下的株高之间也存在显著差异; 30℃和 25℃环境下生长的怀地黄脱毒试管苗的叶片数极显著高于 20℃下生长的叶片数, 且二者之间差异显

著; 在 30℃环境下生长的怀地黄脱毒试管苗的根数和繁殖系数均极显著高于 20℃和 25℃下的根数和繁殖系数, 20℃和 25℃条件下的根数之间差异不显著, 但繁殖系数存在显著差异。所以, 适宜怀地黄脱毒试管苗生长的最适温度值应为 30℃。在此环境条件下生长的怀地黄脱毒试管苗的株高 (5. 8 cm)、叶片数、根数和繁殖系数最高 (可达 4. 8), 且叶色深绿, 茎粗壮。综合以上结果, 认为适合怀地黄试管苗快繁的 pH 值为 5. 8~6. 2、光照强度为 2 500 lx、温度为 30℃。

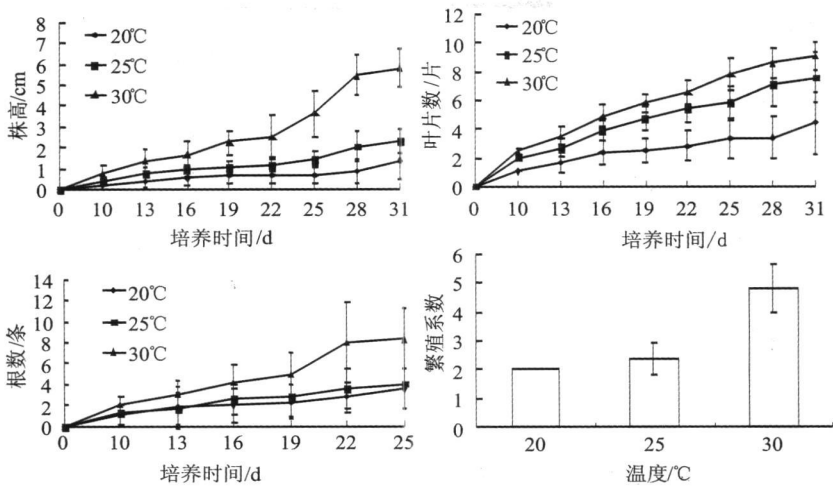


图 3 温度对怀地黄脱毒试管苗株高、叶片数、根数和繁殖系数的影响

3 结论与讨论

植物离体培养中, 影响脱分化和再分化的因子除了内部因素, 如植物的遗传性状和生理状态外, 还有植物细胞的营养条件和环境条件这些外部因素<sup>[11]</sup>。培养基的 pH 值、温度和光照是影响试管苗生长和发育的三大关键因素, 同时也是生产成本的主要构成成分。

3.1 pH 值对怀地黄脱毒试管苗生长发育的影响  
外植体的培养繁殖都要求一定的 pH 值。通常一般培养基的 pH 值为 5~6.5。如果 pH 值不适则直接影响外植体对营养物质的吸收, 进而影响外植体的脱分化、增殖和器官形成。pH 值对不同植物的影响存在差异, 有的植物宜偏酸, 有的宜偏碱。pH 值对柚木组培苗生长及愈伤组织生物量积累有显著影响, 适宜 pH 值为 6.0<sup>[12]</sup>。在蝴蝶兰组培中, 培养基 pH6.5 或培养温度 20℃时外植体褐化率最低, 在相同温度(25℃)下, PPO 活性、总酚含量的高低并不与 pH 值的大小成正比<sup>[13]</sup>。甜椒生根培养的 pH 值为 5.5~6.0<sup>[14]</sup>。本试验结果表明: pH 值在 5.8~6.2 较适合怀地黄脱毒试管苗的生长。由此可见, 环境 pH 值能够影响培养物的分化, 问题在于对不同植物的影响趋势略有差异, 具体规律还有待于进一步探索。

3.2 光照强度对怀地黄脱毒试管苗生长发育的影响

光对组织培养的影响主要表现在光强、光质以及光照时间方面。光照强度对培养细胞的增殖和器官的分化有重要影响, 尤其对外植体细胞的最初分

裂有明显的影响。在诱导细胞分化和器官形成时, 不同材料及不同的生长阶段对光强的要求不同, 一般不需要很强的光, 而在中间繁殖体的增殖阶段和生根阶段, 需要增强光照。一般来说, 光照强度较强, 幼苗生长的就粗壮, 而光照强度较弱幼苗容易徒长。温学森等的研究表明, 光照对叶片直接再生试管地黄的良好发育是必要的<sup>[15]</sup>。马铃薯脱毒试管苗在 3000 lx 光照下植株生长状况最佳<sup>[16]</sup>。光强在一定范围内增强, 能促进姜试管苗的生长, 过高则会抑制, 且品种之间有一定差异<sup>[17]</sup>。本试验通过设置不同的光照条件, 发现株高随光照强度的增加而有降低的趋势, 叶片逐渐增大, 叶片数在不同光照条件下虽有区别, 但差异不显著。怀地黄脱毒试管苗生长的适宜光照强度为 2500 lx 左右。在这一光照条件下, 怀地黄脱毒试管苗生长健壮, 叶色深绿且繁殖系数高。

3.3 温度对怀地黄脱毒试管苗生长发育的影响  
温度是组织培养过程中的重要因素, 温度最重要的作用是决定呼吸的速度和控制植物组织代谢过程的化学反应。温度不仅影响组培苗的生长速度, 也影响其分化增殖以及器官建成等发育进程。在植物组织培养中, 不同植物繁殖的最适温度略有不同, 大约在 23~28℃<sup>[18-23]</sup>。通常低于 15℃时, 培养的外植体组织生长缓慢或出现停滞, 但高于 35℃对植物生长也不利。温学森等研究发现, 地黄脱毒苗快速繁殖时, 可采取 28℃左右的温度, 而诱导形成小地黄时则需采取 23~25℃, 28℃则根部膨大不明显<sup>[15]</sup>。本研究结果表明, 在怀地黄脱毒苗快速繁殖时, 可采取 30℃左右的温度。这一结果与温学森等

的研究结果是一致的, 在生产中可根据具体情况适当调节。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 于相丽, 杨柯金. 怀地黄的研究进展[ J ]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1720-1721.
- [ 2 ] 王民柱. 汉中植物名录[ M ]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1996: 254-256.
- [ 3 ] 颜正华. 中草药[ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 110.
- [ 4 ] 周燕生, 倪慕云. 鲜地黄叶化学成分的研究[ J ]. 中国中药杂志, 1994, 19(3): 162-163.
- [ 5 ] 温学森, 李先恩, 杨世林, 等. 地黄病毒病及其亟待解决的问题[ J ]. 中草药, 2001, 32(7): 662-665.
- [ 6 ] 李明军, 张晓丽, 陈明霞, 等. 怀地黄叶片愈伤组织的诱导形成及其可溶性糖含量变化的研究[ J ]. 河南农业科学, 2005(8): 72-75.
- [ 7 ] 李明军, 徐鑫, 陈明霞, 等. PP<sub>333</sub>对怀地黄试管苗生长和一些生理指标的影响[ J ]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 624.
- [ 8 ] 李明军, 杜琳, 赵喜亭, 等. 培养基成分对怀地黄试管苗生长发育的影响[ J ]. 中草药, 2007, 38(9): 1389-1392.
- [ 9 ] 李明军, 杜琳, 张晓丽, 等. 怀地黄脱毒培养及快速繁殖[ J ]. 农业生物技术学报, 2007, 15(增刊): 131-134.
- [ 10 ] 李明军, 张晓丽, 杜琳, 等. 怀地黄试管苗脱毒技术研究[ J ]. 河南师范大学学报, 2008, 36(2): 103-106.
- [ 11 ] 梁海曼, 马慧群. 蚕豆有丝分裂的影响因素[ J ]. 实验生物学, 1984(17): 265-270.
- [ 12 ] 周再知, 徐大平, 梁坤南, 等. 钙离子及 pH 值对柚木组培苗生长和矿质营养吸收的影响[ J ]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(3): 1-5.
- [ 13 ] 赵伶俐, 葛红, 范崇辉, 等. 蝴蝶兰组培中 pH 和温度对外植体褐化的影响[ J ]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1373-1376.
- [ 14 ] 李进, 顾绘, 许逢美. 环境因子对甜椒组培生根培养的影响[ J ]. 辣椒杂志, 2004(4): 36-37.
- [ 15 ] 温学森, 霍德兰, 杨世林, 等. 地黄优良品种“85-5”脱毒苗的快速繁殖研究[ J ]. 中草药, 2002, 33(5): 452-456.
- [ 16 ] 陈凯, 刘颖, 卢月霞. 培养基与光照强度对马铃薯脱毒试管苗组培快繁的影响[ J ]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1628.
- [ 17 ] 周明, 关秋竹, 韦玉霞, 等. 蔗糖浓度和光强对姜试管苗生长和光合的影响[ J ]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(3): 356-360.
- [ 18 ] 任东植, 李锋, 曲运琴, 等. 影响枣组培苗玻璃化的几个因素及其防治[ J ]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 21-23.
- [ 19 ] 黎兆安, 周祖富, 艾素云, 等. 温度对香蕉组培瓶苗根系生长的影响[ J ]. 广西农业科学, 1997(5): 232-233.
- [ 20 ] 刘春颖, 孙伯铮, 冉学忠. 图德拉草莓快繁及工厂化育苗技术研究[ J ]. 现代农业科技, 2011(1): 122, 126.
- [ 21 ] 夏吟, 柏洁, 陈观水. 福建黄栀的组培快繁技术研究[ J ]. 现代农业科技, 2011(24): 190, 197.
- [ 22 ] 孙云玲, 桃洪源, 田华林, 等. 马蓝组培快繁技术研究[ J ]. 现代农业科技, 2010(9): 102-103.
- [ 23 ] 刘玉佩, 黄雪琳, 康吉利, 等. 非洲菊快繁研究进展[ J ]. 现代农业科技, 2008(21): 77-78, 81.